

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität Marburg

Direktor: Prof. Dr. med. G. W. Löhr

**Über den Einfluß von Äthylalkohol
auf die
Serumlipide Isokalorisch ernährter
Probanden**

**INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg/Lahn**

**Vorgelegt von
Günter Mühlfellner
aus Salzburg**

Marburg/Lahn 1969

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. G. W. Löhr

Über den Einfluß von Äthylalkohol
auf die
Serumlipide isokalorisch ernährter
Probanden

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

Vorgelegt von
Günter Mühlfellner
aus Salzburg

Marburg/Lahn 1969

Angenommen von der Medizinischen Fakultät

der Universität Marburg am 2. 6. 1969

gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. P. Karlson

Referent: Prof. Dr. med. G.W. Löhr

Correferent: Priv. Doz. Dr. med. H. Kaffarnik

Meinen Eltern
in Dankbarkeit gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. Einleitung und Fragestellung	5
B. Methodik	7
a) Versuchsanordnung	7
b) Blutprobenverarbeitung	8
1) Gesamt-Cholesterin	9
2) Freies Cholesterin	11
3) Extraktion der Lipide	13
4) Phosphatide	14
5) Triglyceride	16
6) Freie Fettsäuren	20
C. Statistik	23
D. Ergebnisse	24
E. Diskussion	33
F. Zusammenfassung	42
G. Literaturverzeichnis	43

Einleitung und Fragestellung

Alkoholismus spielt neben alimentären Einflüssen eine zentrale Rolle bei der Entstehung der Fettleber, die Angaben in der Literatur gehen von 10% (71) über 30% (5) bis 52% (63). Nachgewiesen ist auch der häufige Übergang in eine Fettzirrhose. Ein Anstieg der Fettleber-Häufigkeit in den letzten Jahren wird von vielen Autoren gefunden (7,28,63,69,71). - Dabei kommt es unabhängig von der Ätiologie zu einer Störung des Fettstoffwechsels.

Eine Vermehrung der Blutfette finden wir auch beim Formenkreis der Atherosklerose, bei der ebenfalls eine stete Zunahme festzustellen ist (64).

Diese Häufung der Stoffwechselkrankheiten in ihren Ursachen und Entstehungsmechanismen abzuklären war und ist immer noch das Ziel vieler Arbeitsgruppen. Die Wirkung des Äthylalkohols auf den Lipidstoffwechsel und damit unter anderem auf die Fettleberentstehung ist bereits in Tier- und Menschenversuchen geprüft worden (4,7,10,11,14,15,18,34,39,42,43,44,45).

Beziehungen zwischen Alkoholismus und Atherosklerose wurden häufig abgelehnt, z.B. mit der Begründung, Trinker würden frühzeitig sterben, da sie weniger essen (CABOT 1904 (12)).

Beim derzeitigen allgemeinen Wohlstand kann diese Feststellung wohl nicht mehr zutreffen. Bei dem noch immer steigenden Lebensstandard mit den sogenannten Wohlstandstrinkern aber muß man sicher unter anderen Gesichtspunkten an diese Frage herangehen. MUSIL u.a. fanden bei epidemiologischen Untersuchungen auch eine erhöhte Disposition zu Arteriosklerose bei Alkoholo-

likern (45). WYNDER u. Mitarb. fanden bei Untersuchungen an den nikotin- und alkoholabstinent lebenden Mitgliedern der "The Seventh-Day-Adventists" eine geringere Arteriosklerosequote (72).

Viele bisherige Untersuchungen wurden an genesenden Alkoholikern durchgeführt. In den Tierexperimenten wie auch mit Gruppen gesunder Versuchspersonen wurde meistens der Nüchternwert zugrundegelegt. Die Alkoholwirkung wurde also ohne gleichzeitige Nahrungszufuhr geprüft.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem sogenannten Wohlstandstrinken, wobei also zur normalen Kost noch zusätzlich reichlich Alkohol konsumiert wird. Dazu wurde der Fettstoffwechsel klinisch gesunder Probanden untersucht, die während einer isokalorischen Ernährung mit determinierten Alkoholmengen belastet wurden. Bestimmt wurden Gesamtcholesterin, freies Cholesterin, Triglyceride, Phosphatide und freie Fettsäuren.

METHODIK

A. Versuchsanordnung

1. Probanden.

Die Versuchspersonen waren klinisch gesunde 20- bis 40jährige Männer und Frauen.

2. Versuchsbedingungen.

Am Tage vor dem Versuch nahmen die Probanden keinen Alkohol zu sich, am Abend wurde eine leichte, fettarme Mahlzeit eingenommen.

Während der Versuchsdauer unterblieb körperliche Anstrengung, jeweils 1/2 Stunde vor der Blutentnahme wurde Ruhe eingehalten.

3. Dosierung.

a. der isokalorischen Kost:

Alle Versuchspersonen erhielten 25 Kal/kg Körpergewicht pro Tag, verteilt auf 4 Portionen, und zwar um 7 Uhr, unmittelbar nach der Nüchternblutentnahme, um 9³⁰ Uhr, 13³⁰ Uhr und 16³⁰ Uhr jeweils nach den Blutentnahmen.

Die Kost bestand aus Butter, Brötchen, magerem Schinken und 45⁰-Camembert, und zwar in folgendem Kalorien-Verhältnis: 45% Kohlenhydrate, 20% Eiweiß, 35% Fett.

Mineralwasser konnte nach Belieben getrunken werden.

b. des Alkohols:

10 Probanden (Gruppe A) erhielten um 8³⁰ Uhr, also 1 1/2 Stunden nach dem Frühstück und unmittelbar nach der 2. Blutentnahme, 0,5 g/kg Alkohol und dann fortlaufend jede Stunde 0,1 g/kg.

Verabreicht wurde 96% unvergällter Alkohol, verdünnt mit Mineralwasser.

Eine Versuchsgruppe von 5 Probanden (Gruppe G) bekam bei der gleichen Kost statt Alkohol isokalorische Mengen von Glukose.

Weitere 5 Probanden (Gruppe L) bekamen nur die isokalorische Kost.

4. Blutentnahmen:

In den Gruppen A + G erfolgten 9 Blutentnahmen, und zwar um 7⁰⁰ Uhr (Nüchternwert), um 8³⁰ (Basiswert bei isokalorischer Ernährung), 8⁴⁵, 9⁰⁰, 9³⁰, 10³⁰, 13³⁰, 16³⁰ und 20³⁰ Uhr. Die Entnahmen erfolgten jeweils vor der fälligen Alkohol- und Nahrungsaufnahme.

In der Gruppe L wurde 7 mal Blut entnommen, es entfielen die 8⁴⁵- und 9⁰⁰Uhr-Werte.

Das Blut wurde aus leicht gestauten Armvenen entnommen, in heparinisierten Röhrchen aufgefangen und sofort bei $4 \cdot 10^3$ U/min 5 min lang zentrifugiert. Dann wurde das Plasma abpipettiert und bis zur Bestimmung eingefroren.

B. Blutprobenverarbeitung

Wir führten folgende Arbeitsgänge durch:

1. Gesamtcholesterin
2. Freies Cholesterin
3. Extraktion für 4. und 5.
4. Phosphatide
5. Triglyceride
6. Freie Fettsäuren.

1. Gesam t c h o l e s t e r i n

Zur Bestimmung des Gesamtcholesterins bedienen wir uns der Methode von WATSON (68) in der Modifikation nach RICHTERICH und LAUBER (49), die auf der Farbreaktion von LIEBERMANN und BURCHARDT beruht.

Prinzip:

Sterine geben in wasserfreiem Milieu mit Essigsäureanhydrid und konzentrierter Schwefelsäure durch die Bildung polymerer Kohlenwasserstoffe eine blaugrüne Färbung, deren Intensität photometrisch gemessen wird. Durch den Zusatz von methylierten Benzolsulfonsäuren, die das Eiweiß in Lösung halten, wird die sonst übliche Eiweißfällung unnötig.

Chemikalien:

Eisessig p.a.

Cholesterin rein

Essigsäureanhydrid p.a.

konz. Schwefelsäure p.a.

2,5 Dimethyl-Benzolsulfonsäure p.a.

Reagentien:

Cholesterinreagens.

5,5 mg Dimethyl-Benzolsulfonsäure wurden in 100 ml Eisessig gelöst. Dazu werden 300 ml Essigsäureanhydrid und 100 ml Eisessig gegeben. Gut verschlossen, ist das Reagens bei Zimmertemperatur mehrere Monate haltbar.

Cholesterinstandard.

Nach mehrfachem Umkristallisieren und Trocknen in der Trocknepistole wurden 400 mg Cholesterin in 100 ml Eisessig gelöst.

Durchführung der Bestimmung:

In trockene Analysenröhrchen werden 0,05 ml Serum bzw. 0,05 ml destilliertes Wasser für den Leerwert und 2,5 ml Cholesterin=reagens pipettiert. In die Standardröhrchen werden 0,05 ml Standardlösung und 2,5 ml Cholesterinreagens pipettiert. Zur Abkühlung werden die Röhrchen 10 Minuten stehengelassen. Danach erfolgt die Zugabe von 0,5 ml konzentrierter Schwefelsäure zu jedem Ansatz. Es bilden sich Präzipitate, bis zu deren Auflösung die Röhrchen geschüttelt werden müssen. 10 Minuten nach Zugabe der Schwefelsäure werden bei einer Wellenlänge von 578 nm und einer Schichtdicke von 1 cm die Extinktionen im Eppendorf-Photometer gemessen.

Berechnung:

Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz gilt

$$1. \frac{C_p}{C_{St}} = \frac{E_p}{E_{St}}$$

wobei C = Konzentration

E = Extinktion

p = zur Probe gehörig

St = zum Standard gehörig bedeuten. Ebenso gilt

$$2. C_p = \frac{E_p}{E_{St}} \cdot C_{St}$$

Gleiche Konzentrationen von verestertem Cholesterin geben in Chloroform gelöst etwas höhere Extinktionen als im Serum. Es ergibt sich daraus ein Korrekturfaktor von $\frac{405}{400}$.

$$3. \frac{\text{mg Cholesterin}}{100 \text{ ml}} = \frac{E_p}{E_{St}} \cdot 405$$

Kritik:

Durch die Umgehung der sonst üblichen Extraktion und Enteiweißung zur Bestimmung des Gesamtcholesterins werden durch Reduktion der Arbeitsschritte auch die Fehlerquellen vermindert. Falsche Ergebnisse werden bei Verarbeitung von hämolytischen oder ikterischen Seren erhalten.

Fehlerbreite:

Die Fehlerbreite ergab bei 11 Parallelbestimmungen einen Mittelwert von 288 mg / 100 ml mit einer Streuung von $\pm 13,45$ mg / 100 ml. (36,55)

2. F r e i e s C h o l e s t e r i n

Auch für die Bestimmung des freien Cholesterins wandten wir die Methode nach WATSON (68) in der Modifikation nach HOEFLMAYR und FRIED an (33).

Prinzip:

Bei dieser Methode wird das freie Cholesterin zusammen mit dem Eiweiß gefällt. Der Nachweis des freien Cholesterins erfolgt nach der LIEBERMANN-BURCHARDTschen Reaktion.

Chemikalien:

Eisessig p.a.

Cholesterin rein

Essigsäureanhydrid p.a.

konz. Schwefelsäure p.a.

Digitonin p.a.

Isopropanol p.a.

Reagentien:

Cholesterinreagens s. bei 1.

Digitonin 0,25%ig in Isopropanol.

Digitonin-Cholesterinstandard: 200 mg mehrfach umkristallisiertes und getrocknetes Cholesterin und 888 mg kristallines Digitonin werden in 80 ml Eisessig unter Erwärmen gelöst. Nach längerem Sieden wird die Lösung quantitativ in ein 100 ml Meßkölbchen überführt und bis zur Marke mit Eisessig aufgefüllt.

Durchführung der Bestimmung:

Zum Ansetzen von Analyse und Serumleerwert werden je 0,05 ml Serum in Zentrifugengläser gegeben. In die Analysengläser werden zusätzlich 1,0 ml 0,25%ige Digitonin-Isopropanollösung, in die Serumleerwertgläser 1,0 ml Isopropanol gegeben. Nach 10 min wird der entstandene Niederschlag scharf abzentrifugiert, der Überstand verworfen und der Rückstand weiterverarbeitet.

In weiteren Gläsern wird der Standard angesetzt, hier werden zu 0,05 ml Standardlösung bzw. zu 0,05 ml Digitonin-Isopropanollösung (Standardleerwert) 2,5 ml Cholesterin-Reagens zugefügt, ebenso erfolgt die Zugabe von 2,5 ml Cholesterin-Reagens bei Analyse und Serumleerwert.

Der nun entstandene Niederschlag wird bei Analyse und Serumleerwert aufgewirbelt mit einem Glasstab und dann abzentrifugiert. Der klare Überstand wird in frische trockene Reagentengläser überführt und mit 0,5 ml konz. Schwefelsäure versetzt. Nach 10-15minütigem Abkühlen werden die Extinktionen der Analysen gegen die der Leerwerte bei einer Wellenlänge von 578 nm und einer Schichtdicke von 1 cm im Eppendorf-Photometer gemessen.

Berechnung:

$$\text{mg freies Cholesterin} = \frac{E_P}{E_{St}} \cdot 200$$

Fehlerbreite:

SCHNEIDER (55) und KAFFARNIK (36) stellten bei elf Parallelbestimmungen einen Mittelwert von 45 mg / 100 ml mit einem Streubereich von $\pm 7,9$ mg / 100 ml fest.

Kritik:

Es wird mit dem freien Cholesterin zusammen Eiweiß mitgefällt. Durch den bei jeder Serumprobe mitgeführten Serumleerwert wird eventuell mitgerissenes verestertes Cholesterin als Fehlermöglichkeit ausgeschlossen.

Da die Farbtintensität nach 15 Minuten nachläßt, müssen die Extinktionen schnell abgelesen werden.

3. Extraktion der Lipide

Die Extraktion der Lipide für die Bestimmung von Triglyceriden und Phosphatiden wurde nach der Methode von FOLCH und LEES (23) durchgeführt.

Chemikalien:

Chloroform DAB 6

Methanol p.a.

Natriumchlorid p.a.

Durchführung der Extraktion:

Im Meßkölbchen werden 1 ml Serum und 32 ml Chloroform mit Methanol auf 50 ml aufgefüllt, geschüttelt und filtriert. Zur besseren Trennbarkeit werden 20 ml des Filtrats in Schütteltrichter überführt und mit 40 ml gesättigter Kochsalzlösung

versetzt. Nach kräftigem Schütteln und einer anschließenden Wartezeit von 30 Minuten kann die Chloroformphase abgelassen und filtriert werden. Die Weiterverarbeitung des Extrakts ist für die Bestimmung der Triglyceride und Phosphatide verschieden.

4. Phosphatide

Die Bestimmung der Phosphatide erfolgte nach der Methode von BARTLETT (6) mit der Veraschung nach ALLEN (3).

Prinzip:

Im FOLCH-Extrakt wurde der Lipidphosphor bestimmt und die Phosphatide berechnet.

Chemikalien:

70%ige Perchlorsäure p.a.

Ammoniummolybdat p.a.

Natriumsulfit p.a.

1-Amino-2-naphtol-4-sulfonsäure p.a.

Natriumpyrosulfit p.a.

Kaliumdihydrogenphosphat p.a.

konz. Schwefelsäure p.a.

Reagentien:

Reduktionsreagens nach FISKE und SUBBA ROW (22): Zu 200 ml frisch hergestellter 13,7%iger Natriumpyrosulfitlösung werden unter Umrühren 0,5 g 1-Amino-2-naphtol-4-sulfonsäure und 2 g wasserfreies Natriumsulfit gegeben. Die Lösung wird filtriert und in dunkler Flasche aufbewahrt. Sie muß alle 2 - 3 Wochen frisch angesetzt werden.

Ammoniummolybdat 0,22%ig (1,1 g ad 500 ml dest. Wasser)

Anorganischer Phosphorstandard:

0,3509 g des Kaliumdihydrogenphosphat wird nach Trocknung in der Nacht mit Phosphorpentoxyd bei 60° in der Trockenpistole in einem 1000 ml Meßkolben in bidestilliertem Wasser gelöst. Nach Zusatz von 10 ml 10 n Schwefelsäure wird mit bidestilliertem Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Die so hergestellte Stammlösung enthält in 50 ml 0,4 mg Phosphor. Sie ist unbegrenzt haltbar.

Durchführung der Bestimmung:

Die Analyse wird als Doppelbestimmung durchgeführt.

0,5 ml des bei der Triglyceridbestimmung abgezweigten Plasmaextraktes werden eingedampft, mit 0,4 ml 70%iger Perchlorsäure versetzt und 60 Minuten bei 180°C verascht. Nach dem Erkalten erfolgt die Zugabe von 4,6 ml 0,22%iger Ammoniummolybdatlösung und 0,4 ml Reduktionsreagens. Nach gutem Schütteln werden die Röhrchen in ein leicht siedendes Wasserbad gestellt und nach 7 Minuten rasch abgekühlt.

Es werden Leerwerte mitgeführt, indem in leere Gläser 0,4 ml 70%ige Perchlorsäure gegeben wird und dann parallel zu den Analysenproben weiterverfahren wird.

Gesondert werden Standardproben mitgeführt. Hierzu wird am Tag der Bestimmung 2,5 ml der Standardlösung mit bidestilliertem Wasser auf 50 ml verdünnt. In zwei Reagensgläser werden je 0,5 ml Tagesphosphorlösung pipettiert, eingedampft und mit den übrigen Proben weiterverarbeitet.

Das Ablesen der Extinktionen erfolgt gegen den Leerwert bei einer Wellenlänge von 830 nm und einer Schichtdicke von 1 cm im Spektralphotometer nach ZEISS.

Berechnung:

Wegen der Verdünnung der Serumproben beider Extraktionen gegenüber dem nicht extrahierten Standard gilt:

$$\text{Phosphor / ml Serum} = \frac{E_P}{E_{St}} \cdot 4 \cdot 32$$

$$\frac{\text{Phosphor in mg}}{100 \text{ ml}} = \frac{E_P}{E_{St}} \cdot 4 \cdot 32 \cdot 0,1$$

Der Gehalt an Phosphatiden als Lecithin errechnet sich aus dem Phosphorgehalt multipliziert mit 25:

$$\begin{aligned} \frac{\text{mg Phosphatide (als Lecithin)}}{100 \text{ ml}} &= \frac{E_P}{E_{St}} \cdot 25 \cdot 4 \cdot 32 \cdot 0,1 \\ &= \frac{E_P}{E_{St}} \cdot 320 \end{aligned}$$

Kritik:

Durch die siebenminütige Erhitzung bei der Farbbildung wird diese intensiver, und es entsteht ein steiles Absorptionsmaximum bei 830 nm. Durch die hohe Empfindlichkeit der Reaktion ist diese anfällig gegen Verunreinigungen, insbesondere gegen Reste von Spülmitteln oder schlechtes destilliertes Wasser.

Fehlerbreite:

Bei 11 Parallelbestimmungen ergab sich bei einem Mittelwert von 229 mg / 100 ml eine Standardabweichung von $\pm 4,09$ mg / 100 ml (36,55).

5. T r i g l y c e r i d e

Die Triglyceridbestimmung wird nach der Methode von HANDEL und ZILVERSMIT (66) mit Hilfe der Reaktion von LAMBERT und NEISH (38) durchgeführt.

Prinzip:

Das im Chloroformextrakt befindliche Glycerin ist Bestandteil von Phosphatiden, Mono-, Di- und Triglyceriden. Die Phosphate werden durch Adsorption an aktiviertes Kieselgel abgetrennt. Die Glyceride werden vollständig verseift, das Glycerin oxydiert und der in äquimolarer Menge entstehende Formaldehyd mit Chromotropsäure zur Bildung eines photometrisch meßbaren Farbkomplexes gebracht.

Chemikalien:

konz. Schwefelsäure p.a.

Äthanol p.a.

Natriumperjodat p.a.

Kaliumhydroxid p.a.

Natriumhydroxid p.a.

Arsentrioxid p.a.

Chromotrop-Natriumsalz p.a.

Tristearin p.a.

Kieselgel 0,08 mm

Reagentien:

0,4%ige alkoholische Kalilauge (2%ige KOH wird vor Gebrauch mit Äthanol 1:5 verdünnt)

0,2 n Schwefelsäure (3 ml konz. Schwefelsäure wurden mit destilliertem Wasser auf 500 ml aufgefüllt)

0,05 mol Natriumperjodat (1,07 g ad 100 ml dest. Wasser)

0,5 mol Natriumarsenat (2,25 g NaOH + 5 g As_2O_3 ad 100 ml dest. Wasser)

0,2%ige Chromotropsäure (2,24 g Chromotrop-Natriumsalz ad 200 ml aqua bidest.) = Lösung A.

600 ml konz. Schwefelsäure werden vorsichtig unter Kühlung zu

300 ml dest. Wasser gegeben = Lösung B. Nach dem Erkalten werden Lösung A und Lösung B zusammengegeben. Die Chromotropsäure muß in dunkler Flasche im Kühlschrank aufbewahrt werden und ist so 2 - 3 Wochen haltbar.

Triglyceridstandard: 0,5 g Tristearin werden in Chloroform p.a. gelöst und ad 100 ml aufgefüllt. Die Eichlösung enthält 5000 μg Glyceride pro ml.

Durchführung der Bestimmung:

1 ml des Triglyceridstandards wird wie die oben beschriebene Extraktion des Plasmas extrahiert.

Etwa 10 ml des Chloroformextrakts von Plasma und Standard werden mit je 1 g aktiviertem Kieselgel (1 Stunde bei 100°C im Trockenschrank) versetzt, kräftig geschüttelt und filtriert.

Je 0,5 ml des Filtrats werden in 3 Reagensgläser mit Schliffstopfenverschluß pipettiert und in einem leicht kochenden Wasserbad eingedampft. Ebenso wird mit je 0,5 ml Standardfiltrat verfahren. Nach Abkühlung werden in je zwei der Röhrchen je 0,5 ml 0,4%ige alkoholische Kalilauge (verseifte Probe = späterer Meßwert) gegeben, das dritte Röhrchen wird mit 0,5 ml Äthanol versetzt (unverseifte Probe = späterer Leerwert).

Nach Durchschütteln wird in einem Wasserbad von 60 - 70°C eine 15minütige Verseifung durchgeführt, hierzu werden Glasstopfen lose auf die Röhrchen aufgesetzt. Nach Abkühlung werden zu allen Proben je 0,5 ml 0,2 n Schwefelsäure gegeben.

Dann wird der Alkohol im kochenden Wasserbad vollständig verdampft. Sobald der Alkoholgeruch im Dampf verschwunden ist, werden die Proben wieder abgekühlt und zur Oxydation des Glycerins mit je 0,1 ml 0,05 mol Natriumperjodatlösung versetzt und durchgeschüttelt. Die Proben werden 15 Minuten stehenge-

lassen, dann wird die Oxydation durch Zugabe von 0,1 ml 0,5 mol Natriumarsenat beendet. Nach weiteren 10 Minuten werden in jedes Glas unter Lichtabschluß 5 ml 0,2%ige Chromotropsäure gegeben, geschüttelt und dann im Dunkeln bei 100°C erhitzt (Trockenschrank). Die photometrische Messung der abgekühlten Proben erfolgt gegen den Leerwert im Eppendorf-Photometer bei einer Wellenlänge von 578 nm bei einer Schichtdicke von 1 cm.

Berechnung:

$$\begin{aligned} \frac{\text{mg Triglyceride}}{100 \text{ ml}} &= \frac{E_P}{E_{St}} \cdot 5000 \cdot 0,1 \\ &= \frac{E_P}{E_{St}} \cdot 500 \end{aligned}$$

Kritik:

Die Reaktion ist nicht für Formaldehyd spezifisch. Bei vollständiger Abdampfung des Alkohols sind jedoch keine ins Gewicht fallenden Störmöglichkeiten gegeben, da im Glycerid-Extrakt keine anderen mit Perjodat reagierenden Verbindungen vorkommen. Bei unvollständigem Abdampfen von Alkohol werden die Proben beim Erhitzen mit Chromotropsäure trübe.

Das Verdampfen von Glyceriden wird verhindert durch die Zugabe von Wasser (bzw. 0,2 n Schwefelsäure).

Neben den Triglyceriden werden die in geringer Menge vorkommenden Diglyceride miterfaßt. Da die Monoglyceride in der unverseiften Leerwertprobe ebenfalls Formaldehyd abgeben, kommt es zu einer entsprechenden Farbbildung im Leerwert, die eine Miterfassung der Monoglyceride verhindert.

Fehlerbreite:

Die Fehlerbreite bei elf Parallelbestimmungen ergab bei einem Mittelwert von 185 mg / 100 ml einen Streubereich von $\pm 7,05$ mg / 100 ml (36,55).

6. Freie Fettsäuren

Zur Bestimmung der freien Fettsäuren fand in leicht modifizierter Form die Methode nach DUNCOMBE (16) Anwendung.

Prinzip:

Die freien Fettsäuren werden mit Chloroform als Kupfersalz extrahiert, anschließend wird das Kupfer mit Diäthylthiocarbamat kolorimetrisch nachgewiesen.

Chemikalien:

Chloroform p.a.

Kupfer (II)nitrat p.a.

Diäthylthiocarbamat p.a.

Triäthanolaminhydrochlorid p.a.

Natriumhydroxid p.a.

Palmitinsäure p.a.

sekundäres Butanol p.a.

Reagentien:

Kupferreagens: 6,45%ige Kupfer(II)nitratlösung wird mit 1 molarer Triäthanolaminhydrochloridlösung (18,57 g / 100 ml bidestilliertes Wasser) am Tag der Bestimmung gemischt und mit gesättigter Natronlauge auf pH 7,5 eingestellt.

Diäthylthioicarbamat 0,25%ig in sekundärem Butanol.

Palmitinsäurestandard: 0,1 mM:

12,85 mg Pamitinsäure p.a. werden in Chloroform gelöst und auf 500 ml aufgefüllt.

Vor dem Versuch wird die Stammlösung 1:4 verdünnt. Durch diese Verdünnung wird eine Ablesung im optimalen Skalenbereich ermöglicht.

Die Extinktion des Standards muß mit 4 multipliziert werden.

Durchführung der Bestimmung:

Die Untersuchung wird als Dreifachbestimmung durchgeführt. In Schliffstopfenverschlußgläser werden 5 ml Chloroform bzw. 5 ml Palmitinsäurestandard, 2,5 ml Kupferreagens und 0,5 ml Plasma bzw. als Leerwert Aqua bidestillata pipettiert. Nach sorgfältigem Verschluß mit Glasstopfen werden die Gläser in einem Schüttelapparat mit einer Frequenz von 120 U/min 15 Minuten lang waagrecht geschüttelt. Anschließend wird der Inhalt der Gläser in Zentrifugengläser überführt und 15 Minuten bei $4 \cdot 10^3$ U/min zentrifugiert. Dann wird die wäßrige Kupfersalzphase mit einer PVC-Kanüle abgesaugt und die als Trennmembran entstandene Proteinschicht im Ganzen mit einer weitlumigeren Glaspipette entfernt. Anschließend werden 3 ml der Chloroformphase abpipettiert, ohne die Glaswand der Zentrifugenröhrchen mit der Pipette zu berühren. Hierzu werden 0,5 ml Diäthylldithiocarbamat gegeben, geschüttelt und im Eppendorff-Photometer bei 440 nm und einer Schichtdicke von 1 cm die Extinktionen gegen den Leerwert gemessen.

Berechnung:

$$\begin{aligned} \frac{\text{mval Freie Fettsäuren}}{l} &= \frac{E_P}{E_{St}} \cdot 0,1 \cdot 10 \\ &= \frac{E_P}{E_{St}} \end{aligned}$$

Kritik:

Der Aufwand dieser Methode ist gegenüber den Titrationsmethoden geringer, da sie nicht in CO₂-freier Atmosphäre durchgeführt werden muß.

Es entfällt ferner der subjektive Faktor beim Ablesen des Farbumschlags. Hämolytisches oder ikterisches Plasma beeinträchtigt die Genauigkeit.

Fehlerbreite:

Zur Bestimmung der Fehlerbreite führten SCHNEIDER und KAFFAR=NIK 11 Parallelbestimmungen im gleichen Plasma durch. Sie fanden einen Mittelwert von 0,424 mval/l und einen Streubereich von $\pm 0,016$ mval/l (36,55).

C. STATISTIK

Zur Berechnung der statistischen Signifikanz bedienen wir uns des FRIEDMAN-Testes, der zum Vergleich von mehr als zwei abhängigen Stichproben hinsichtlich ihrer Mittelwerte dient (73). Von den jeweils zusammengehörigen Meßwerten, von denen der kleinste den Rang 1 erhält, wird eine Rangreihe gebildet. Die Rangsumme T der n Meßwerte wird in jeder der k Stichproben gebildet.

Die Größe

$$\chi^2 = \frac{12}{n \cdot k \cdot (k+1)} \cdot \sum_{i=1}^k T_i^2 - 3n(k+1)$$

ist χ^2 verteilt mit $f = k - 1$ Freiheitsgraden.

Der Ausdruck

$$w = \frac{1}{2^{\frac{f}{2}} \cdot \Gamma(\frac{f}{2})} \int_0^{\chi^2} \frac{f-2}{x^2} \cdot \frac{-x}{e^{\frac{x}{2}}} \cdot dx$$

gibt die Fläche unter der χ^2 -Verteilungskurve von 0 bis χ^2 an. Daraus berechnet sich die gesuchte Irrtumswahrscheinlichkeit in % zu

$$\alpha = 50 \cdot (1-w).$$

Ist $\alpha \leq 5$, dann liegt beim Vergleich von mehr als 2 Stichproben Signifikanz vor.

D. ERGEBNISSE

Bestimmt wurden die Kurvenverläufe im Vergleich zum Nüchternwert und im Vergleich zum Basiswert der isokalorischen Ernährung.

Dabei zeigten sich in Gruppe A signifikante Anstiege der Triglyceride und Phosphatide in beiden Vergleichen. Die freien Fettsäuren fielen im Vergleich zum Nüchternwert signifikant ab, nach dem Frühstück kam es zu keiner Signifikanz. Gesamtcholesterin und freies Cholesterin änderten sich nur unwesentlich (Tab. I).

In Gruppe G waren die freien Fettsäuren zu beiden Vergleichswerten signifikant verändert, die Phosphatide, Triglycerid- und Cholesterinveränderungen waren nicht signifikant (Tab. II).

In Gruppe L kam es zu keinen signifikanten Änderungen (Tab. III).

Gesamt-Cholesterin		Freies Cholesterin		Phosphatide		Triglyceride		Freie Fettsäuren	
Mittelw.	Streuung	Mittelw.	Streuung	Mittelw.	Streuung	Mittelw.	Streuung	Mittelw.	Streuung
209,000	± 45,097	76,500	± 21,004	194,900	± 38,783	115,500	± 43,270	0,173	± 0,074
203,000	± 42,947	77,400	± 15,565	187,300	± 37,107	116,600	± 44,428	0,096	± 0,034
202,600	± 43,390	77,400	± 11,664	189,100	± 32,590	142,000	± 46,337	0,096	± 0,038
198,600	± 43,349	75,800	± 16,565	193,800	± 34,169	141,900	± 53,320	0,093	± 0,033
204,600	± 32,788	78,500	± 19,341	194,200	± 37,365	137,700	± 47,015	0,095	± 0,034
206,600	± 42,719	77,400	± 13,962	194,300	± 33,483	152,600	± 60,440	0,104	± 0,045
201,200	± 40,395	78,800	± 6,015	214,800	± 39,208	202,600	± 90,722	0,104	± 0,026
201,600	± 38,123	73,900	± 9,826	221,300	± 36,185	216,200	± 95,479	0,102	± 0,023
204,400	± 48,544	68,900	± 10,692	222,400	± 37,107	179,200	± 77,366	0,135	± 0,042

Signifikanz gegen Nüchternwert

χ^2 10,107

6,647

α 25,762

57,519

Signifikanz gegen Basiswert

χ^2 6,767

6,342

α 45,357

50,047

22,240

48,747

52,160

6,647

α 25,762

0,449 s

8,792

40,333

49,017

6,342

α 45,357

0,449 s

26,796

0,000 s

0,000 s

50,047

α 45,357

0,449 s

Tabelle I: Mittelwerte der Fraktionen Gesamt-Cholesterin, Freies Cholesterin, Phosphatide, Triglyceride (alle in mg/100 ml) und Freie Fettsäuren (in mval/l) in der Alkoholgruppe.

Gesamt-Cholesterin		Freies Cholesterin		Phosphatide		Triglyceride		Freie Fettsäuren	
Mittelw. Streuung		Mittelw. Streuung		Mittelw. Streuung		Mittelw. Streuung		Mittelw. Streuung	
259,400	+ 27,465	78,800	+ 21,112	232,200	+ 34,120	111,800	+ 29,372	0,281	+ 0,73
253,000	+ 44,525	86,000	+ 22,705	231,000	+ 29,925	123,600	+ 39,991	0,107	+ 0,026
270,400	+ 48,675	83,600	+ 18,338	241,000	+ 34,307	119,400	+ 40,501	0,109	+ 0,024
262,200	+ 37,212	78,800	+ 20,873	234,800	+ 29,668	117,200	+ 55,088	0,093	+ 0,023
252,000	+ 30,635	66,800	+ 23,972	235,600	+ 30,146	104,400	+ 46,511	0,080	+ 0,023
245,200	+ 20,777	81,600	+ 18,008	224,600	+ 26,941	104,200	+ 47,641	0,073	+ 0,30
249,200	+ 30,178	83,000	+ 20,408	217,800	+ 17,326	105,600	+ 48,768	0,107	+ 0,080
252,800	+ 23,382	65,600	+ 10,502	220,800	+ 10,964	146,200	+ 91,819	0,126	+ 0,024
244,200	+ 13,405	69,600	+ 24,286	214,400	+ 22,300	122,600	+ 68,358	0,099	+ 0,020

Signifikanz gegen Nüchternwert

 χ^2 6,800

10,320

 α 55,836

24,328

Signifikanz gegen Basiswert

 χ^2 5,150

11,333

 α 64,166

12,473

14,160

12,147

7,769

14,478

23,827

0,245 s

13,667

12,133

5,744

9,626

14,783

3,888 s

Tabelle II: Mittelwerte der Fraktionen Gesamt-Cholesterin, Freies Cholesterin, Phosphatide, Triglyceride (alle in mg/100ml) und Freie Fettsäuren (in mval/l) in der Glukosegruppe.

Gesamt-Cholesterin		Freies Cholesterin		Phosphatide		Triglyceride		Freie Fettsäuren	
Mittelw.	Streuung	Mittelw.	Streuung	Mittelw.	Streuung	Mittelw.	Streuung	Mittelw.	Streuung
216,200	± 24,160	87,000	± 20,421	238,800	± 35,238	105,800	± 37,619	0,229	± 0,081
216,200	± 24,509	86,800	± 23,026	240,000	± 37,477	114,000	± 42,988	0,137	± 0,089
209,200	± 35,309	79,800	± 11,432	225,400	± 26,140	113,000	± 35,336	0,143	± 0,110
215,600	± 21,208	76,200	± 13,700	224,800	± 21,661	120,600	± 55,053	0,107	± 0,034
205,000	± 32,688	79,600	± 15,502	225,200	± 16,483	139,800	± 63,077	0,163	± 0,065
208,800	± 23,488	83,400	± 12,934	235,800	± 16,498	136,600	± 46,479	0,163	± 0,056
207,600	± 29,339	77,800	± 16,769	225,200	± 19,357	135,200	± 42,405	0,187	± 0,080

Signifikanz gegen Nichternwert

 χ^2 3,000

8,314

3,900

8,143

8,850

 α 80,885

21,597

69,021

22,782

18,219

Signifikanz gegen Basiswert

 χ^2 2,371

6,029

3,143

5,457

6,400

 α 79,572

30,345

67,797

36,267

26,922

Tabelle III: Mittelwerte der Fraktionen Gesamt-Cholesterin, Freies Cholesterin, Phosphatide, Triglyceride (alle in mg/100 ml) und Freie Fettsäuren (in mval/l) in der Leergruppe.

Die Triglyceridmittelwerte in der Alkoholgruppe stiegen von 115 (Nüchternwert) bzw. 116 mg/100 ml auf 216 mg/100 ml, also fast um 100%. Der letzte Wert am Abend war allerdings mit 179 mg/100 ml niedriger.

In der Glukosegruppe kam es nach einem vorübergehenden Abfall ebenfalls zu einem leichten Anstieg, die Ausgangswerte lagen bei 111 bzw. 123 mg/100 ml, der tiefste Wert 104 und der höchste 146 mg/100 ml. Die Änderungen waren jedoch nicht signifikant, ähnlich wie in der Gruppe L, in der die Triglycerid-Mittelwerte von 105 bzw. 114 mg/100 ml sich allmählich auf ein höheres Niveau von beinahe 140 mg/100 ml einpendelten (Abb.1).



Abb. 1: Verhalten der Triglyceride unter Alkohol (A), Glukose (G) und unter isokalorischer Kost allein (L). Die Pfeile zeigen die Mahlzeiten an.

Die Phosphatid-Mittelwerte der Gruppe A waren von 194 bzw. 187 mg/100 ml konstant angestiegen bis 222 mg/100 ml. In der Gruppe G war es fast umgekehrt. Bei einem Ausgangswert von 232 bzw. 231 mg/100 ml kam es nach einem kurzen Anstieg auf 241 mg/100 ml unmittelbar nach der ersten Glukosegabe zu einem steten Abfall bis auf 214 mg/100 ml. In der Gruppe L pendelten sich die Phosphatide auf einem niedrigeren Niveau ein, die Veränderungen waren nicht signifikant (Abb. 2).

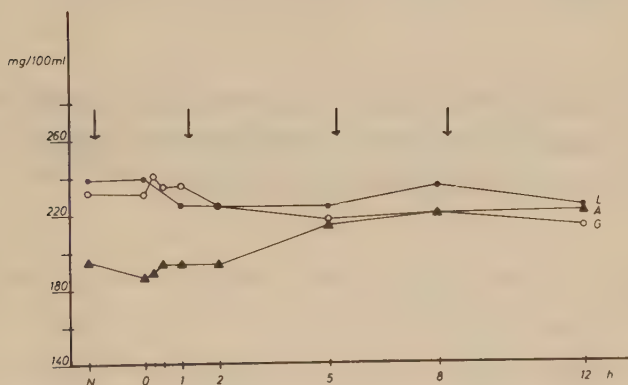


Abb. 2: Verhalten der Phosphatide unter Alkohol (A), Glukose (G) und unter isokalorischer Kost allein (L). Die Pfeile zeigen die Mahlzeiten an.

Das Verhalten der freien Fettsäuren war in allen drei Gruppen anfänglich gleichlaufend (Abb. 3): Nach dem Frühstück kam es zu einem starken Abfall.

In der Gruppe A blieben die Werte vorerst auf diesem Niveau,

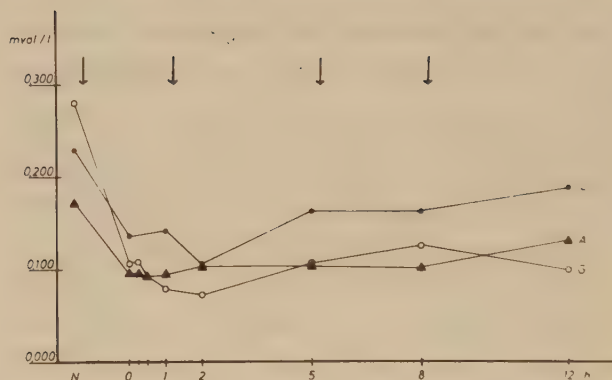


Abb. 3: Verhalten der Freien Fettsäuren unter Alkohol (A), Glukose (G) und unter isokalorischer Kost allein (L). Die Pfeile zeigen die Mahlzeiten an.

erst der letzte Wert zeigte einen Anstieg, ohne daß der Ausgangswert erreicht wurde.

In der Vergleichsgruppe G fiel das Niveau nach der Glukosegabe und im weiteren Verlauf zuerst sogar noch weiter ab, ein wesentlicher Anstieg war nicht zu erkennen.

In der Leergruppe schwankten die Werte, der Ausgangswert wurde auch hier nicht erreicht.

Abb. 4 zeigt die Kurven des Gesamt-Cholesterins, Abb. 5 die des freien Cholesterins.

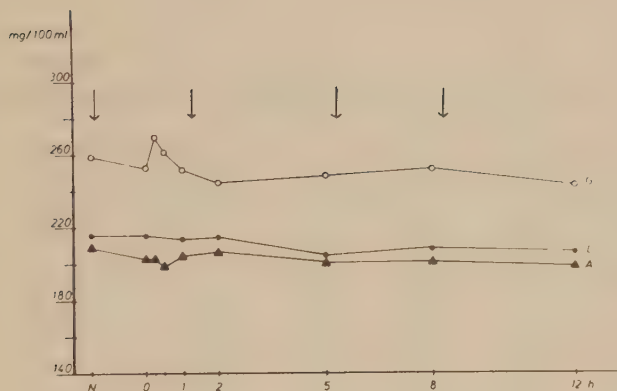


Abb. 4: Verhalten des Gesamt-Cholesterins unter Alkohol (A), Glukose (G) und unter isokalorischer Kost allein (L). Die Pfeile zeigen die Mahlzeiten an.

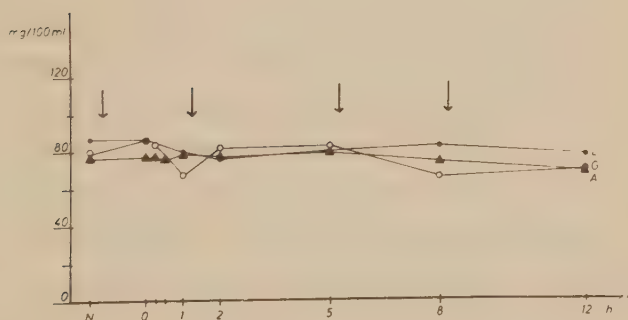


Abb. 5: Verhalten des Freien Cholesterins unter Alkohol (A), Glukose (G) und unter isokalorischer Kost allein (L). Die Pfeile zeigen die Mahlzeiten an.

Die Blutalkoholspiegel gehen aus Tab. IV hervor, die Bestimmung erfolgte nach der photometrischen Methode von WIDMARK.

Name	Nu.	15'	30'	1 ^h	2 ^h	5 ^h	8 ^h	12 ^h
K.A.	0,13	0,31	0,42	0,46	0,42	0,33	0,14	0,09
G.M.	0,05	0,81	0,62	0,52	0,46	0,36	0,27	0,18
G.B.	0,12	0,75	1,07	0,47	0,47	0,40	0,15	0,00
G.G.	0,08	0,56	0,79	0,62	0,57	0,57	0,34	0,25
W.H.	0,02	0,60	0,54	0,49	0,48	0,45	0,37	0,25
S.W.	0,07	0,36	0,53	0,52	0,62	0,43	0,64	0,34
E.A.	0,09	0,09	0,24	0,40	0,59	0,54	0,53	0,32
M.G.	0,12	0,24	0,46	0,81	0,59	0,39	0,19	0,16
M.O.	0,02	0,64	0,69	0,60	0,62	0,55	0,46	0,45
Kr.H.	0,02	0,43	0,55	0,54	0,54	0,55	0,48	0,35

Tabelle IV: Blutalkoholbestimmung nach der photometrischen Methode von WIDMARK.

E. DISKUSSION

Bei der Beurteilung der Ergebnisse ist zu berücksichtigen, daß sowohl gegen den Nüchternwert wie auch gegen den ersten Wert nach dem Frühstück verglichen wurde. Übereinstimmend in allen 3 Vergleichsgruppen unterschieden sich diese Werte in den Fraktionen Gesamt-Cholesterin, freies Cholesterin, Phosphatide und Triglyceride nicht wesentlich. Dementsprechend sind auch die Ergebnisse in etwa gleich.

Bei den freien Fettsäuren hingegen fand sich - ebenfalls in allen drei Gruppen - bereits nach dem Frühstück ein deutlicher Abfall, so daß bei dieser Fraktion also gegen zwei unterschiedliche Werte verglichen wurde.

Die Fraktionen Gesamt- und freies Cholesterin waren in der Alkohol- wie in den beiden Vergleichsgruppen nicht signifikant verändert. Gleiche Ergebnisse hat SCHNEIDER (55) an Nüchternprobanden, GRANDE (27) fand einen Cholesterinanstieg erst bei sehr hohen Alkoholdosen. GOTTLIEB und Mitarb. (26) fanden im Tierversuch dagegen eine ausgeprägte Hypercholesterinämie und Atherosklerose in Langzeitversuchen.

Die Phosphatide und die Triglyceride waren in der Alkoholgruppe signifikant erhöht, wobei der Triglycerid-Anstieg aber wesentlich höher war. In den Kontrollgruppen gab es keine signifikanten Anstiege, die Phosphatide fielen in der Glukosegruppe sogar eher ab.

Einen Anstieg der Triglyceride fanden auch JONES (35), SCHAPIRO (52) und SCHNEIDER (55). Daß ein wenn auch geringer Anstieg der Phosphatide zustande kommt, sahen NIKKILÄ und

OALA (48) an Ratten, sowie TALBOTT und KEATING (61). Einige Autoren fanden keine signifikanten Änderungen nach Alkohol (41).

Bei unseren Versuchsgruppen kam es nach dem Frühstück zu einem deutlichen Abfall der freien Fettsäuren. In der Alkoholgruppe stellte sich nach der Alkoholgabe keine Veränderung dar, die Kurve verlief praktisch linear, nur der letzte Wert (12 Stunden nach der 1. Alkoholgabe) lag gering höher, ohne den Ausgangswert auch nur annähernd zu erreichen. War der Abfall gegen den Nüchternwert signifikant, so zeigte der weitere Kurvenverlauf keine signifikante Änderung.

Im Gegensatz dazu war in der Glukosegruppe der Abfall der freien Fettsäuren sowohl nach dem Frühstück wie auch nach der Glukosegabe signifikant. In der Kontrollgruppe L kam es zu keiner Signifikanz.

Jeweils an nüchternen Probanden sahen mehrere Autoren einen initialen Abfall nach der Alkoholgabe, der 30-60 Minuten dauerte. Anschließend kam es zu einem Anstieg mehr oder minder weit über den Ausgangswert (40,55).

Bei Versuchen mit Tritium-markierter Palmitinsäure fanden NESTEL und HIRSCH (46) einen vermehrten Einbau von freien Fettsäuren in die Triglyceride nach Alkohol, nach Glukose hingegen einen erniedrigten gegenüber Nüchternen.

Als Ursache wurde die Adrenalinsynthese-erregende Wirkung des Äthanolis angenommen, die 1958 von ABELIN (1) nachgewiesen worden war. So zeigten SHAFRIR und GORIN (57) nach Adrenalininjektion einen Anstieg der freien Fettsäuren des Plasmas, nach Glukose einen Abfall.

FEIGELSON (19) fand nach Injektion von Adrenalin oder Noradrenalin in die Vena portae ein Ausbleiben der Anstiege der freien Fettsäuren und auch der Triglyceride. BOUCHIER und DAWSON (8) konnten nach Vorbehandlung mit einem Beta-Rezeptorenblocker den Anstieg der freien Fettsäuren im Blut nach Äthanol verhindern.

Unsere Versuche unterscheiden sich von denen von SCHNEIDER (55) darin, daß isokalorisch ernährte Probanden mit Äthylalkohol belastet wurden. Im Gegensatz zu uns fand SCHNEIDER nach einem initialen Abfall der freien Fettsäuren einen Anstieg weit über den Ausgangswert. BÖHLE und Mitarbeiter (7) führten ähnliche Untersuchungen durch, wobei sie nüchternen Versuchspersonen 3 verschiedene Alkoholdosen als einmalige Gabe verabreichten. Dabei fanden sie entgegengesetzte Reaktionsweisen. Sie folgerten, daß geringe Alkoholmengen lipolysehemmend wirken könnten, während eine bestimmte größere Menge das sympathikoadrenale System anregen sollte. ABELIN (1) hatte aber 1958 unabhängig von der Alkoholdosis (er verabreichte zwischen 0,5 und 1,27 g/kg) die vermehrte Adrenalinausscheidung im Harn gefunden.

Der Abfall der freien Fettsäuren bei unseren Probanden bereits nach dem Frühstück dürfte auf die Kohlenhydrat- und auch Eiweißzufuhr zurückzuführen sein (25,30,56). Der lineare Kurvenverlauf nach den Alkoholgaben würde dann aus 2 verschiedenen Komponenten entstehen: der die freien Fettsäuren steigern Wirkung des Alkohols (über die Adrenalinausschüttung) und der die freien Fettsäuren senkenden Wirkung der Nahrungskohlenhydrate. Dafür spricht auch, daß Glukosegaben die freien Fettsäuren weiter senken (Glukosegruppe).

Auch die Untersuchungen von SICKINGER (59) zeigten, daß die alkoholinduzierte periphere Lipolyse durch Lipolysehemmer allein nicht gehemmt werden konnte, während zusätzliche Glukosegaben je nach Dosis zu einer mehr oder weniger starken Verminderung des Abstromes der freien Fettsäuren aus dem Fettgewebe führen.

Unter normalen Umständen besteht ein Gleichgewicht zwischen Lipolyse und Reveresterung im Fettgewebe (s. Abb. 6).

Freie Fettsäuren $\rightleftharpoons$ Triglyceride

Normal: Lipolyse = Reveresterung

Freie Fettsäuren $\rightleftharpoons$ Triglyceride

Glukose: Reveresterung gesteigert
Lipolyse unverändert

Freie Fettsäuren $\rightleftharpoons$ Triglyceride

Adrenalin: Reveresterung gesteigert
Lipolyse stark gesteigert

Freie Fettsäuren $\rightleftharpoons$ Triglyceride

Glukose + Adrenalin: Reveresterung stark gesteigert
Lipolyse stark gesteigert
Lipolyse = Reveresterung

Abb. 6: Der Einfluß von Glukose und Adrenalin auf Lipolyse und Reveresterung im peripheren Fettgewebe.

Bei einem Glukoseüberschuß gewinnt die Reveresterung die Oberhand, da L-alpha-glycerophosphat als Acceptor der freien Fettsäuren zur Verfügung steht (17,31,58,60,65,70). Unter

der Adrenalinwirkung wird dagegen die Lipolyse stark gesteigert (50,51). Isokalorisch ernährte Versuchspersonen zeigten unter Äthanolzufuhr keinen Anstieg der freien Fettsäuren des Plasmas. Die von anderen Autoren beschriebene äthanol- und damit wahrscheinlich adrenalin-induzierte periphere Lipolyse führt offensichtlich deshalb nicht zu einem Anstieg der freien Fettsäuren des Plasmas, weil die mit der Nahrung aufgenommene Kohlenhydrate eine sofortige Reveresterung bewirken (Abb. 6). Die für die Triglyceridsynthese in der Leber benötigten freien Fettsäuren stammen hier also aus der Nahrung, zum Teil aus dem Nahrungsfett, das ja teilweise in die Leber aufgenommen wird, während die größere Menge aber über den Ductus thoracicus direkt in die Fettdepots gelangt. Zum größeren Teil entstehen die freien Fettsäuren in der Leber aus den Nahrungskohlenhydraten über den Citronensäurecyclus, es ist also die Glykolyse mit einer Synthese der freien Fettsäuren verbunden (37).

Daß auch unsere Triglycerid-Erhöhungen äthanolbedingt sind, zeigt einmal der Vergleich mit der Glukose- und der Leergruppe, zum anderen ergibt der Vergleich mit der Alkoholgruppe B von SCHNEIDER (55), daß die Anstiege etwa gleichgroß sind. Verantwortlich für die Vermehrung der Plasmatriglyceride ist die alkoholspezifische Stoffwechsellage in der Leber, die zu einer gesteigerten Triglyceridsynthese führt (Abb. 7). Auf den Mechanismus gehen wir weiter unten ein.

In unserer Reihe fällt zusätzlich der rasche Anstieg der Triglyceride unmittelbar nach der 1. Alkoholgabe auf. Dieser könnte durch die resorptionsfördernde Wirkung des Alkohols zustandekommen. So zeigten TALBOTT und KEATING (61), daß

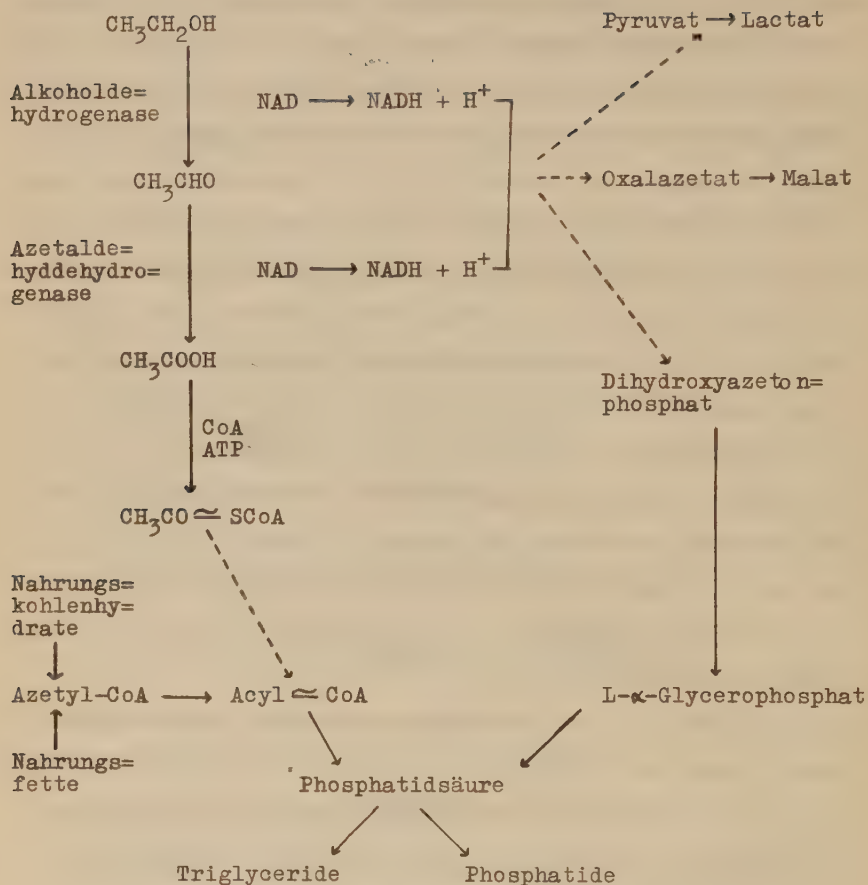


Abb. 7: Schema der alkoholspezifischen Triglyceridsynthese in der Leber.

Whisky vor einer fettreichen Mahlzeit eine stärkere Lipiderhöhung bewirkt als Whisky allein. HEIFER und REINECKE (32) konnten allerdings bei Fett vor Alkohol-Belastung nur in zwei Fällen einen Resorptions-fördernden Einfluß finden, während bei 6 Probanden kein meßbarer Einfluß sichtbar wurde.

Daß auch die Phosphatide signifikant anstiegen, ist verständlich, wenn man sich vor Augen führt, daß aus Phosphatidsäure, die aus L-alpha-glycerophosphat und aktivierter Fettsäure entstanden ist, sowohl Triglyceride wie Phosphatide gebildet werden (Abb. 7).

Ähnlich unseren Ergebnissen fanden auch NIKKILÄ und OJALA (48), TALBOTT und KEATING (61), WAKABAYASHI (67) und SCHEIG (53), daß unter Alkohol die Triglycerid-Bildung die Phosphatid-Synthese bei weitem übertrifft.

Zur Frage der Fettleber und Fettleberentstehung gibt es zahlreiche Arbeiten, speziell auch über die alkoholische Genese (5,7,28,29,39,55,62,69,71). Es wird angenommen, daß die alkoholbedingte Lipolyse bzw. der dadurch vermehrte Einstrom der freien Fettsäuren des Plasmas in die Leber auf der einen Seite, auf der anderen eine ebenfalls alkoholinduzierte Steigerung der Lipoidsynthese, insbesondere die der Triglyceridfraktion, in der Leber als Hauptursachen anzusprechen sind (7,36,39).

FEIGELSON (19) konnte nach Leberperfusion mit freien Fettsäuren eine Triglycerid-Anreicherung im Perfusionsmedium feststellen, die nach Alkoholzugabe anstieg. Auch NESTEL und STEINBERG (47) konnten an isolierten Rattenlebern eine sehr

rasche Aufnahme der freien Fettsäuren aus dem Perfusat sehen. Wie bereits weiter oben erwähnt, glauben wir nach unseren Versuchsergebnissen, daß die in der Leber benötigten freien Fettsäuren isokalorisch ernährter Probanden überwiegend aus der Nahrung und aus dem Alkohol stammen. Beim Abbau in der Leber entsteht aus Äthanol durch die Alkohol-Dehydrogenase Acetaldehyd, der unter Acetaldehyd-Dehydrogenase weiter zu Acetat oxydiert wird. Bei beiden Vorgängen entsteht jeweils aus NAD (DPN) NADH (DPNH). Acetat wird mit CoA weiter abgebaut zu Acetyl-CoA, das in den Citronensäurecyclus münden, zu CO_2 abgebaut werden oder zur Synthese der freien Fettsäuren herangezogen werden kann.

Der $\text{NADH} + \text{H} / \text{NAD}$ -Quotient ist also unter Äthanol erhöht. Diesem Anstieg folgen Verschiebungen in anderen Redoxsystemen, die von ihm abhängig sind: Lactat/Pyruvat, Malat/Oxalacetat und vor allem auch L-alpha-glycerophosphat/Dihydroxyacetonphosphat. Dieses L-alpha-glycerophosphat, das in einem Seitenweg der Glykolyse gebildet wird, ist, wie SHAPIRO (58), TZUR (65) und andere zeigen konnten, als Hauptacceptor für die freien Fettsäuren anzusprechen.

Somit führt die alkoholspezifische Stoffwechsellage in der Leber zu einer gesteigerten Triglycerid-Synthese. Durch die begrenzte Kapazität der Leber, die gebildeten Triglyceride als Lipoproteide auszuschleusen, kommt es neben der Triglyceridämie zur Fetteinlagerung in der Leber selbst (29,68). Die alkoholinduzierte Vermehrung der Plasmatriglyceride weist nach dem gegenwärtigen Stand der Atheroskleroseforschung auf den möglichen Zusammenhang zwischen Alkoholkonsum und Atherosklerose hin. Eine Erhöhung der Blutfette stellt

einen heute überall anerkannten Risikofaktor für die Atherosklerose dar. Bis vor wenigen Jahren sollte vor allem die Hypercholesterinämie eine wesentliche Rolle spielen. Erst in den letzten Jahren wurde auf die hervorragende Bedeutung der Triglyceride hingewiesen (2,13,21,54). Auch in der FRAMINGHAM-Studie ist eine deutliche Korrelation zwischen Coronarsklerose und Triglyceriderhöhung zu sehen (24). BRAUNSTEINER und Mitarbeiter (9) zeigten beim Vergleich von gesunden Personen mit Patienten mit Herzinfarkt eine Erhöhung aller Blutfette bei letzteren, vor allem aber der Triglyceride.

F. ZUSAMMENFASSUNG

1. An 10 stoffwechselgesunden Probanden wurden unter isokalorischer Ernährung eine Alkoholbelastung mit stündlich verabreichten Einzeldosen durchgeführt und die Blutlipide Gesamtcholesterin, freies Cholesterin, Phosphatide, Triglyceride und freie Fettsäuren bestimmt. Eine Kontrollgruppe von 5 Probanden erhielt an Stelle von Alkohol isokalorische Glukosemengen. Weitere 5 Probanden erhielten lediglich die isokalorische Kost.
2. Unter Alkohol kam es zu signifikanten Anstiegen der Triglycerid- und Phosphatid-Fraktionen. Das freie Cholesterin sowie das Gesamtcholesterin blieben unverändert.
3. Die freien Fettsäuren fielen in allen 3 Gruppen bereits nach dem Frühstück ab, in der Alkoholgruppe kam es anschließend zu keinen signifikanten Änderungen mehr, während nach Glukose ein weiterer signifikanter Abfall zu sehen war.
4. Isokalorisch ernährte Probanden zeigen unter Alkoholzufuhr keinen Anstieg der freien Fettsäuren im Plasma, weil die periphere Lipolyse durch die Reveresterung infolge der zugeführten Kohlenhydrate kompensiert wird.
5. Die für die Triglycerid-Synthese in der Leber benötigten freien Fettsäuren entstammen überwiegend der Nahrung.
6. Unsere Versuchsergebnisse bekräftigen die Möglichkeit, daß die Atherosklerose durch Alkoholkonsum gefördert wird.

G. LITERATURVERZEICHNIS

1. ABELIN, I., HERREN, C., BERLI, W.: Über die erregende Wirkung des Alkohols auf den Adrenalin- und Noradrenalinhaushalt des menschlichen Organismus
Helv.med.Acta 25, 591 (1958)
2. ALBRINK, M.J.: Triglycerides, lipoproteins and Coronary Artery Disease
Arch.Int.Med. 109, 345 (1962)
3. ALLEN, R.J.L.: The Estimation of Phosphorus
Biochem. J. 34, 858 (1940)
4. AMMON, H.P.T., ESTLER, C.J., ZELLER, W., PFEIFFER, R.: Zeitlicher Zusammenhang zwischen Blutalkoholspiegel und Änderung des Lipidgehaltes im Blut und Leber
Medizina pharmacol.Exp. 14, 585 (1966)
5. BAIER, H., KNICK, B., v.d.EMDEN, A., RUCKES, J.: Fettleber, Fettsucht und latenter Diabetes
Med. Welt 1813, 1861 (1964)
6. BARTLETT, G.R.: Phosphorus essay in column Chromatography
J. Biol. Chem. 234, 466 (1959)
7. BÖHLE, E., ERB, W., MAY, B., BARTERT, G., MELANI, E., DIT= SCHUNEIT, H.: Blutlipide und Fettleber. In: Fettlebersymposium Erlangen (1967)
Pallas-Verlag Lochham bei München (1968)
8. BOUCHIER, J.A.D., DAWSON, A.M.: The Effect of Infusions of Ethanol on the plasma free fatty acids in man
Clin. Sci. 26, 47 (1964)
9. BRAUNSTEINER, H., SAILER, S. SANDHOFER, F., DI PAULI, R., GABL, F., JUNG, A.: Lipidwerte bei gesunden Personen und Patienten mit Myokardinfarkt
Wien.Klin.Wo.schrift 77, 859 (1965)
10. BRODIE, B.B., BUTLER, W.M.jr., HORNING, M.C., MAICKEL, R.P., MALING, H.M.: Alcohol induced Triglyceride deposition in liver through derangement of fat transport
Amer.J.Clin.Nutr. 2, 432 (1961)
11. BRODIE, B.B., MAICKEL, R.P.: Role of sympathetic nervous system in drug induced fatty livers
Anu. New York Acad. Sc. 104, 1049 (1963)

12. CABOT, R.C.: Relation of alcohol to arterio-sclerosis
J. A. M. A. 43, 774 (1904)
13. CARLSON, L.A.: Serum lipids in men with myocardial infarction
Acta med. scand. 167, 399 (1960)
14. DI LUZIO, N.R.: Effect of acute ethanol intoxication on liver and plasma lipid fractions of the rat
Amer.J.Physiol. 194, 453 (1958)
15. DI LUZIO, N.R.,
POGGI, M.: Abnormal lipid tolerance and hyperlipemia in acute ethanol-treated rats
Life Sciences S.751 (1963, 10)
16. DUNCOMBE, W.G.: The colorimetric microdetermination of nonesterified fatty acids in plasma
Clin.Chim.Acta 9, 122 (1964)
17. EGGSTEIN, M.: Über Wechselbeziehungen zwischen Blutfetten und Glukosemetaboliten. I. Weltfettkongreß Hamburg (1964)
Pallas-Verlag, Lochham bei München (1965)
18. ELKO, E.E., WOOLLES,
W.R., DI LUZIO, N.R.: Alterations and mobilization of lipids in acute ethanol-treated rats
Amer.J.Physiol. 201, 923 (1961)
19. FEIGELSON, E.B.,
PFAFF, W.W. KARMEN, A.,
STEINBERG, D.: The role of plasma FFA in development of fatty liver
J.Clin.Invest. 40, 2171 (1961)
20. FEIGL, J.: Neue Untersuchungen zur Chemie des Blutes bei akuter Alkoholin=toxikation und bei chronischem Alkoholismus mit besonderer Berücksichtigung der Fette und Lipide. Chemische Untersuchungen zur Kenntnis der Entwicklung und des Aufbaus von Lipämien V,
Biochem.Zeitschr. 92, 282 (1918)
21. FELDMAN, R.G.,
ALBRINK, M.J.: Serum lipid and Cerebrovascular disease
Arch. Neurol. (Chic.) 10, 91 (1964)
22. FISKE, C.M., SUBBA ROW,
Y.: The Colorimetric determination of phosphorus
J.Biol.Chem. 66, 375 (1925)

23. FOLCH, J., LEES, M., SLOANE-STANLEY, D.H.: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues
J.Biol.Chem. 226, 497 (1957)
24. FRAMINGHAM-STUDIE zit. nach 54
25. GORDON, R.S., CHERKES, A., GATES, H.: zitiert nach 56
26. GOTTLIEB, L.S., BREITMAN, S.A., VITALE, J.J., ZAMCHECK, N.: The influence of alcohols and dietary magnesium hypercholesterolemia and atherogenesis in the rat
J.Lab.clin.Med. 53, 433 (1959)
27. GRANDE, F., HAY, L.J., HEUPEL, H.W., AMATUZIO, D.S.: Effect of ethanol on serum cholesterol concentration in dog and man
Circulation Res. 8, 810 (1960)
28. GROS, H., MÜLLER, E.: Ätiologie und klinische Befunde der Fettleber
Med. Klin. 60, 125 (1965)
29. HARTMANN, F.: Zur Pathogenese der Fettleber. Fettleber-Symposium, Erlangen (1968)
Pallas-Verlag Lochham bei München (1968)
30. HASHIM, S.A.: zitiert nach 56
31. HAVEL, R.J.: Early effects of fasting and of Carbohydrate ingestion and lipoproteins of serum in man
J.clin.Invest. 36, 855 (1957)
32. HEIFER, U., REINECKE, J.: Untersuchungen über die wechselseitige Beeinflussung von Alkohol- und Fettresorption
Estratto da 'ZACCHIA' 41, 3 (1966)
33. HOEFLMAYR, H., FRIED, R.: Eine rasch durchführbare Methode zur Bestimmung des freien Cholesterins
Med. Welt 1964, 2015
34. HORNING, M.G., WILLIAMS, E.A., MALING, H.M., BRODIE, B.B.: Depot fat as source of increased liver Triglycerides after Ethanol, Biochem. Biophys. Res. Comm. 3, 635 (1960)
35. JONES, D.P., LOSOWSKY, M.S., DAVIDSON, C.S.: Effects of Ethanol on plasma lipids in man
J.Lab.Clin.Med. 62, 675 (1963)

36. KAFFARNIK, H.: Klinische und biochemische Untersuchungen von essentiellen, symptomatischen und induzierten Vermehrungen der Serumlipide
Habilitationsschrift, Marburg 1968
37. KARLSON, P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie
Georg Thieme Verlag (1962)
38. LAMBERT, H., A.C. NEISH: Rapid method for estimation of glycerol in fermentation solutions,
Canad.J.Res. 28, 83 (1950)
39. LIEBER, C.S., DE CARLI, L.M., DAVIDSON, C.S.: Comparison of hepatic synthesis and peripheral mobilization of fat in the production of ethanol induced fatty liver
Clin. Res. 10, 230 (1962)
40. LIEBER, C.S., LEEVY, C.M., STEIN, S.: Effect of ethanol on plasma free fatty acids in man
J.Lab.Clin.Med. 59, 826 (1962)
41. LUND, E., GEILL, T., DAM, H., KOISTENSEN, G.: Serum lipids in relation to the intake of alcohol and sodium chloride
Nature 191, 1095 (1961)
42. MAICKEL, R.P., PAOLETTI, R.: Role of pituitary-adrenal system in derangement of fat mobilization produced by ethanol
Fed. Proc. 20, 276 (1960)
43. MALING, H.M., HORNING, M.G., BUTLER, W.M. jr., HIGHMAN, B., BRODIE, B.B.: Triglyceride deposition in rat liver through derangement fat transport by various chemical agents
Fed. Proc. 19, 229 (1960)
44. MALLOV, S.: Effect of chronic ethanol intoxication on liver lipid content of rats
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. NY 88, 246 (1955)
45. MUSIL, F., MUSILOVA, Z., POKORNY, M., PROKOP, V.: Epidemiologische Faktoren und Lipidstoffwechsel bei Arteriosklerose. In: 1. Weltkongreß Hamburg 1964
Pallas-Verlag Lochham bei München (1965)
46. NESTEL, P.J., HIRSCH, E.Z.: Mechanism of alcohol-induced hypertriglyceridemia
J.Lab.Clin.Med. 66, 357 (1962)

47. NESTEL, P.J., STEINBERG, D.: Fate of palmitate and of linoleate perfused through the isolated rat liver at high concentrations
J. lipid. Res. 4, 461 (1963)
48. NIKKILÄ, E.A. OJALA, K.: Effect of ethanol on the synthesis of liver triglycerides and phospholipids from circulation palmitic acid - 1 - C¹⁴
Ann.Med.exp.Fenn. 41, 254 (1963)
49. RICHTERICH, R., LAUBER, K.: Bestimmung des Gesamtcholesterins im Serum VIII Mitteilung über Ultramikro Methoden im klinischen Laboratorium
Klin. Wo. 40, 1252 (1962)
50. RIZACK, M.A.: An epinephrine sensitive lipolytic activity in adipose tissue,
J. Biol. Chem. 236, 657 (1961)
51. RIZACK, M.A.: Activation of adrenaline sensitive lipolytic activity from adipose tissue by adenosine 3'5' phosphate
J. Biol. Chem. 239, 392 (1964)
52. SCHAPIRO, R.H., SCHEIG, R.L., DRUMMEY, G.D., MENDELSON, J.H., ISSELBACHER, K.J.: Effect of prolonged ethanol ingestion on the transport and metabolism of lipids in man,
New Engl.J.Med. 272, 610 (1965)
53. SCHEIG, R.L. ISSELBACHER, K.J.: Effects of ethanol on the liver: evidence for preferential synthesis of triglycerides
J.Clin.Invest. 42, 975 (1963)
54. SCHETTLER, G.: Arteriosklerose
Georg Thieme Verlag Stuttgart 1961, S.306
55. SCHNEIDER, J.: Zur kurzfristigen Wirkung des Äthylalkohols auf die Serumlipide bei gesunden Versuchspersonen
Inaug.Diss. Marburg, in Vorbereitung
56. SCHRADER, W., BÖHLE, E., BIEGLER, R.: Über Fortschritte der Fettstoffwechselforschung und ihre klinische Bedeutung
Dtsch.med.Wschr. 86, 781 (1961)
57. SHAFRIR, E., GORIN, E.: Release of glycerol in conditions of fat mobilisation and deposition,
Metabolism 12, 580 (1965)

58. SHAPIRO, B., STATTER, M.
ROSE, G.: Pathways of triglyceride formation in adipose tissue
Biochim. Biophys. Acta 44, 373 (1960)
59. SICKINGER, K.: Notwendigkeit von Glukose zur Langzeitblockierung der Lipolyse mit 3,5-Dimethylisoxazol und 5-Methylpyrazol-3-Carbonsäure
Klin. Wschr. 46, 563 (1968)
60. STEINBERG, D.: zitiert nach 70
61. TALBOTT, G.D.,
KEATING, B.M.: Effects of preprandial whiskey on postalimentary lipemia
Geriatrics 17, 802 (1962)
62. TARNOWSKY, W.: Störungen des Fett- und Kohlenhydratstoffwechsels als mögliche Ursachen der Fettleber
Fettleber-Symposium Erlangen 1967
Pallas-Verlag Lochham bei München (1968)
63. THALER, H.: Die Fettleber und ihre Probleme,
Der Internist 7, 21 (1966)
64. Todesursachenstatistik des Statistischen Bundesamtes
1952 - 1958
65. TZUR, R., TAL, E.,
SHAPIRO, B.: Glycerophosphate as regulatory factor in fatty acid esterification
Biochim. Biophys. Acta 84, 18 (1964)
66. VAN HANDEL, E.,
ZILVERSMIT, D.B.: Micromethod for the direct determination of serumglycerides
J.Lab.Clin.Med. 50, 152 (1957)
67. WAKABAYASHI, M.,
HORNING, M.G., MALING, H.M.,
BRODIE, D.B.: Fed. Proc. 20, 276 (1961)
68. WATSON, D.: A simple method for the determination of serum cholesterol
Clin.Chim.Acta 5, 637 (1960)
69. WEWALKA, F.: Pathogenese und Klinik der Leberverfettungen. In: Pathophysiologie des Fett-Transportes und Fettstoffwechsels. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Fettwissenschaft, Karlsruhe 1963, Pallas-Verlag Lochham bei München

70. WIELAND, O.:
Der intermediäre Stoffwechsel
des Fettgewebes im Hinblick auf
die Koordination des Energie=
haushaltes. In: Die Pathogenese
des Diabetes mellitus. Die endo=
krine Regulation des Fettstoff=
wechsels. 12. Symposium der
Deutschen Gesellschaft für Endo=
krinologie. Herausgegeben von
E. Klein
Springer-Verlag Berlin-Heidel=
berg-New York (1967)
71. WILDHIRT, E.:
Über die Häufigkeit der Fettle=
ber aus klinischer Sicht. In:
Fettleber-Symposium Erlangen 1967,
Pallas-Verlag Lochham (1968)
72. WYNDER, E.L., LEMON,
F.R., BROSS, I.J.:
Cancer and coronary artery dis=
ease among Seventh-Day Adventists,
Cancer (Philadelphia) 12, 1016
(1959)
73. KREYSZIG, E.:
Statistische Methoden und ihre
Anwendungen
Vandenhoeck & Ruprecht, Göttingen
(1965)

Herrn Prof. Dr. G.W. Löhr gilt mein Dank für die Möglichkeit der wissenschaftlichen Arbeit an der Medizinischen Poliklinik der Universität Marburg.

Herrn Dr. H. Kaffarnik bin ich zu großem Dank für die Überlassung des Themas und die zahlreichen Hinweise und Anregungen verpflichtet.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. F. Schleyer für die Durchführung der Blutalkoholbestimmungen im Gerichtsmedizinischen Institut sowie Herrn Diplom-Mathematiker P. Zöfel vom Rechenzentrum der Universität Marburg für die statistische Bearbeitung der Ergebnisse.

Lebenslauf

Am 6.3.1941 wurde ich in Salzburg als Sohn des Josef Mühlfellner und der Marianne, geb. Repas, aus Obertrum bei Salzburg geboren. Die Volksschule besuchte ich von 1947 bis 1951 in Obertrum, anschließend kam ich an das Humanistische Gymnasium in Salzburg, wo ich im Herbst 1959 maturierte. Anschließend leistete ich meinen Militärdienst beim Österreichischen Bundesheer ab. Im Herbst 1960 begann ich in Wien das Medizinstudium. Den vorklinischen Teil beendete ich mit dem 1. Rigorosum im Sommersemester 1963. Im Herbst 1963 wechselte ich nach Marburg, wo ich im Herbst 1966 mit dem Staatsexamen mein Medizinstudium beendete. Zur Zeit leist ich noch meine Medizinalassistentenzeit hier in Marburg ab. Seit dem 19. April 1965 bin ich mit meiner Studienkollegin Ortrun Kempin verheiratet.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten

in Wien:

Brücke, Chiari, Hayek, Jesserer, Krause, Kunz, Lauda, Leipert, Mainx, Moritsch, Pantlitschko, Pischinger, Schubert, Seelich, Wiedmann, Zakorsky, Zenker,

in Marburg:

Berendes, Beckmann, Bommer, Braun-Falco, Buchholz, Dittrich, Exner, Gedigk, Grüter, Hamm, Heuser, Hildebrandt, Jakob, Lang, Linneweh, Mann, Martini, Maurath, du Mesnil de Rochemont, Neubauer, Oehme, Rodeck, Rodenhäuser, Rohen, Salfeld, Schiff, Schleyer, Schmid, Schmidt, Schrappe, Schwaiger, Siegert, Straub, Streicher, Würterle.

